

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPBL007 株を利用して生産された
 α -アミラーゼ

令和4年（2022年）3月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
<審議の経緯>	3
<食品安全委員会委員名簿>	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>	3
要 約	4
Ⅰ. 評価対象添加物の概要	5
Ⅱ. 安全性に係る知見の概要	5
第 1. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺 伝子組換え添加物及び組換え体との相違	5
1. 従来 of 添加物の性質及び用途等に関する資料	5
2. 宿主及び導入 DNA	6
3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料	6
4. 宿主の構成成分等に関する資料	6
5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	6
6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物 及び組換え体と宿主等の相違点	7
第 2. 宿主に関する事項	7
1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項	7
2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項	7
3. 寄生性及び定着性に関する事項	7
4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項	8
5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項	8
第 3. ベクターに関する事項	8
1. 名称及び由来に関する事項	8
2. 性質に関する事項	8
第 4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカ―を含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項	9
3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカ―遺伝子の発現に関わる領域に関する事 項	11
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項	11
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項	12
7. 抗生物質耐性マーカ―遺伝子の安全性に関する事項	12
第 5. 組換え体に関する事項	13
1. 宿主との差異に関する事項	13
2. 遺伝子導入に関する事項	13
第 6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	14

1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること	14
2. 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること	14
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項	14
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	14
2. 組換え体の残存に関する事項	14
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	14
4. 精製方法及びその効果に関する事項	14
5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項	15
第8. 第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項	15
Ⅲ. 食品健康影響評価	15
<参照>	16

<審議の経緯>

- 2022年1月4日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0104第2号）、関係書類の接受
- 2022年1月18日 第844回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2022年1月28日 第221回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2022年3月8日 第850回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- 山本 茂貴（委員長）
- 浅野 哲（委員長代理 第一順位）
- 川西 徹（委員長代理 第二順位）
- 脇 昌子（委員長代理 第三順位）
- 香西 みどり
- 松永 和紀
- 吉田 充

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

- 中島 春紫（座長）
- 山川 隆（座長代理）
- | | |
|--------|--------|
| 安達 玲子 | 小野 竜一 |
| 岡田 由美子 | 近藤 一成 |
| 小関 良宏 | 樋口 恭子 |
| 小野 道之 | 藤原 すみれ |

<第221回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

- 児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

要 約

「JPBL007 株を利用して生産された α -アミラーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953 株由来の α -アミラーゼ遺伝子を導入することで作製した JPBL007 株を利用して生産された α -アミラーゼである。本添加物は、グルコース重合体の α -1,4 結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素であり、デンプン糖製造に使用される。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性、アレルギー誘発性等について確認した結果、従来 of 添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

以上のことから、「JPBL007 株を利用して生産された α -アミラーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象添加物の概要

(申請内容)

名称：JPBL007 株を利用して生産された α -アミラーゼ

用途：デンプン糖製造

申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S (デンマーク)

本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953 株由来の α -アミラーゼ遺伝子を導入することで作製した JPBL007 株を利用して生産された α -アミラーゼである。本添加物は、グルコース重合体の α -1,4 結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素であり、デンプン糖製造に使用される。

II. 食品健康影響評価

第 1. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名称： α -アミラーゼ (SP961)

生産菌：*Bacillus licheniformis*

有効成分： α -アミラーゼ

IUB No. : EC 3.2.1.1

CAS No. : 9000-90-2

(2) 製造方法

SP961 は、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

SP961 は、アミロースやアミロペクチン等のグルコース重合体の α -1,4-グルコシド結合をエンド型で加水分解する酵素である。

デンプン糖製造において、主に液化の工程で SP961 を添加することで、デンプンがデキストリンまで分解されるため、デンプン糖製造を目的に、加工助剤として使用されている。なお、デンプン糖製造工程において、SP961 は取り除かれる。

(4) 摂取量

既存の α -アミラーゼ製品が全て本添加物を用いた製品に置き換わり、全ての「砂糖・甘味料類」の製造に使用され、最終製品中に 100% 残存す

ると仮定した場合、最大一日摂取量は 4.3 µg TOS (Total Organic Solids) / kg 体重/日である。

2. 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主は、*B. licheniformis* Ca63 株である。*B. licheniformis* Ca63 株は、自然界から分離された菌株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

amyBE2330 遺伝子の供与体は、*G. stearothermophilus* ATCC7953 株である。*prsA* 遺伝子の供与体は、*B. licheniformis* Ca63 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amyBE2330 遺伝子は、*G. stearothermophilus* ATCC7953 株由来の α -アミラーゼ (*amyBE2330*) をコードする。*prsA* 遺伝子は、菌体外分泌を促進する細胞膜タンパク質である PrsA タンパク質をコードする。

amyBE2330 遺伝子発現カセットをインテグラーゼにより宿主ゲノムの標的遺伝子座に導入した。その際、標的遺伝子座において遺伝子欠失が確認された。*prsA* 遺伝子発現カセットは相同組換えにより標的遺伝子座に導入した。（参照 1）

3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

B. licheniformis は、食品や食品用酵素の製造において、長年にわたり安全に使用されている（参照 2）。また、*B. licheniformis* Ca63 株は、 α -アミラーゼの生産菌として用いられている。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

B. licheniformis が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル（以下「BSL」という。）1 に相当する。（参照 2~4）

5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は、以下のとおりである。

製品名：amyBE2330

有効成分： α -アミラーゼ

IUB No.：EC 3.2.1.1

CAS No.：9000-90-2

(2) 製造方法

amyBE2330 は、JPBL007 株を生産菌として、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、2 回の除菌・ろ過により分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

amyBE2330 は、従来の添加物と同様に、デンプン糖の製造において、加工助剤として使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

amyBE2330 は、従来の添加物と同様に、デンプンを加水分解する。

6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

amyBE2330 と従来の α -アミラーゼ (SP961) との相違点は、アミノ酸残基数、推定分子量、至適温度及び pH が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPBL007 株と宿主との相違点は、JPBL007 株には *amyBE2330* 遺伝子が導入され、 α -アミラーゼの高産生性を獲得している点、*prsA* 遺伝子を導入している点及び α -アミラーゼの生産性を高めるため複数の遺伝子を欠失している点である。

1 から 6 までから、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、以下の各事項について評価を行った。

第 2. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は、*B. licheniformis* Ca63 株である。

2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

B. licheniformis が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する。（参照 2~4）

3. 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis には、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はない。

4. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

B. licheniformis には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

B. licheniformis の近縁種には、*B. subtilis* 及び *B. pumilus* が知られているが、毒性物質を産生する *B. cereus* 等とは明確に区別されている。(参照 5)。

第3. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV034 及び pJPV035 の作製には、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pE194 が用いられた。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pE194 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pE194 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pE194 の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pE194 には、エリスロマイシン耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pE194 には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pE194 の複製開始配列は、*Bacillus* 属で機能する。

第4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

amyBE2330 遺伝子の供与体は *G. stearothermophilus* ATCC7953 株である。*prsA* 遺伝子の供与体は、*B. licheniformis* Ca63 株である。

(2) 安全性に関する事項

G. stearothermophilus は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。*B. licheniformis* Ca63 株は、長年の使用経験があり、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。これらは、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する。(参照 2~4)

2. 挿入 DNA 又は遺伝子 (抗生物質耐性マーカーを含む。) 及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング又は 合成方法に関する事項

amyBE2330 遺伝子は、*G. stearothermophilus* ATCC7953 株より PCR 法により取得した α -アミラーゼ遺伝子に位置特異的変異導入法を用いて複数のアミノ酸が置換及び欠失する改変を加えた。また、*B. licheniformis* Ca63 株由来の α -アミラーゼ遺伝子のシグナル配列が付加されている。

prsA 遺伝子は、*B. licheniformis* Ca63 株より PCR 法により得られた。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入 DNA の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は、明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *amyBE2330* 遺伝子

amyBE2330 遺伝子がコードする *amyBE2330* は、デンプンの α -1,4-グルコシド結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素である (参照 6)。*amyBE2330* の α -アミラーゼ活性ドメインには、酸性条件下での熱安定性の向上を目的としてアミノ酸置換が加えられている。

a. 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

G. stearothermophilus のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^aを行った。その結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見

amyBE2330 を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。*G. stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^aを行った。その結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

^a PubMed、検索日：2020 年 1 月

c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

(a) 人工胃液に対する感受性

amyBE2330 の人工胃液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、両試験において、試験開始後 30 秒以内にバンドが消失したため、分解されることが示された。(参照 7)

(b) 人工腸液に対する感受性

amy BE2330 の人工腸液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、両試験において、6 時間の処理においても完全には分解されないことが示された。(参照 7)

(c) 加熱処理に対する感受性

amy BE2330 の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH4.0 の各温度帯で 30 分処理した後の活性を測定した。その結果、110°C の処理によって完全に失活することが示された。(参照 8)

d. 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

amyBE2330 と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べるため、アレルゲンデータベース^bを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、真菌由来のアレルゲン (Asp o 21 及び Asp o 21.0101) が認められた。一方、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。(参照 9)

詳細は、第 5-2-(2) に記載のとおりである。

② *prsA* 遺伝子

prsA 遺伝子は、菌体外分泌を促進する細胞膜タンパク質である PrsA タンパク質をコードし、SP961 の菌体外分泌量を増加させる(参照 10)。PrsA タンパク質についてアレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はない。また、既に安全性審査を終了した「NZYM-AV 株を利用して生産された α -アミラーゼ」の生産菌にも導入されている。

以上のことから、amyBE2330 及び PrsA タンパク質がアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(The Food Allergy Research and Resource Program; FARRP, version 21)

3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

amyBE2330 遺伝子及び *prsA* 遺伝子のプロモーターは、*amyL4199* プロモーター、*amyQsc* プロモーター及び *cry3A* プロモーターで構成される P3 プロモーター配列である。*amyL4199* プロモーター及び *amyQsc* プロモーターは、それぞれ *B. liceniformis* Ca63 株由来の *amyL* プロモーター及び *B. amyloliquefaciens* DSM7 株由来の *amyQ* プロモーターに変異を導入したものである。*cry3A* プロモーターは、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM5525 株に由来する *cry3A* 遺伝子の野生型プロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

amyBE2330 遺伝子のターミネーターは、*B. liceniformis* Ca63 株由来の *amyL* ターミネーター配列である。*prsA* 遺伝子のターミネーターは、*B. clausii* DSM8716 株由来の *aprH* ターミネーター配列である。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

amy BE2330 遺伝子の発現制御に、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM5525 株由来の *cry3A* mRNA 安定化配列及び *B. amyloliquefaciens* DSM7 株由来の *aprQ* RBS 配列を用いている。*Cry3A* mRNA 安定化配列は、殺虫活性を示すタンパク質をコードする遺伝子上流に存在する配列であり、タンパク質をコードする領域は含まれない。そのほか、インテグラーゼ認識配列 (*attR* 配列) を用いている。

prsA 遺伝子の発現制御に、*cry3A* mRNA 安定化配列を用いている。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pE194 に、インテグラーゼ遺伝子断片、*cry3A* mRNA 安定化配列断片、*aprQ* RBS/*amyBE2330* 遺伝子断片等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV034 を作製した。同様に、プラスミド pE194 に、*prsA* 遺伝子断片、*cry3A* mRNA 安定化配列断片等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV035 を作製した。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV034 及び pJPV035 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。(参照 11、12)

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

第5-2-(2)に記載のとおりである。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

遺伝子導入用ベクターpJPV034 及び pJPV035 上の意図する挿入領域は、それぞれ *amyBE2330* 遺伝子発現カセット及び *prsA* 遺伝子発現カセットを含む領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

遺伝子導入用ベクターpJPV034 及び pJPV035 は、構築の過程において精製されていることから、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

宿主ゲノムの *amyBE2330* 遺伝子導入標的遺伝子座に、あらかじめマーカー遺伝子発現カセット (P3 プロモーター、*cry3A* mRNA 安定化配列、マーカー遺伝子及びインテグラーゼ認識配列を含む) を相同組換えにより導入し、マーカーにより選抜した。

その後、遺伝子導入用ベクターpJPV034 を導入し、インテグラーゼの作用により、*amyBE2330* 遺伝子発現カセットを挿入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜した。標的遺伝子座においては、*cry3A* mRNA 安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子、インテグラーゼ遺伝子、インテグラーゼ認識配列及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落した。

宿主ゲノムの *prsA* 遺伝子導入標的遺伝子座に、あらかじめマーカー遺伝子発現カセット (P3 プロモーター、*cry3A* mRNA 安定化配列及びマーカー遺伝子を含む) を相同組換えにより導入し、マーカーにより選抜した。次に、遺伝子導入用ベクターpJPV035 を相同組換えにより導入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜した。その後、*cry3A* mRNA 安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落した。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクターpJPV034 及び pJPV035 は、エリスロマイシン耐性遺伝子を持ち、染色体に挿入されるが、ループアウトで脱落するため宿主

の染色体には導入されない。また、生産菌株に抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことをシーケンス解析により確認している。

第5. 組換え体に関する事項

1. 宿主との差異に関する事項

JPBL007株は、*amyBE2330* 遺伝子発現カセット及び *prsA* 遺伝子発現カセットが導入され、 α -アミラーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失している。

2. 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

JPBL007株の染色体上への *amyBE2330* 遺伝子発現カセット及び *prsA* 遺伝子発現カセットの導入位置を確認する目的で、シーケンス解析を行った。その結果、設計通り各遺伝子座に全長の発現カセットが挿入されたことが確認された（参照 13）。また、挿入領域の各構成要素及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

挿入 DNA と宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）の有無を調べる目的で、各標的遺伝子座における挿入 DNA 並びにこれらの 5'近傍配列領域を含む領域及び 3'近傍配列を含む領域及び異種遺伝子断片が残存する遺伝子座領域について ORF 検索を行った（参照 9、14~17）。その結果、6つの読み枠において、終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 270 個検出された。

次いで、上記の ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を調べる目的で、アレルゲンデータベース^bを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン Asp o 21 及び Asp o 21.0101（参照 9）並びに Pin k 2.0101（参照 16）が検出された。しかしながら、Asp o 21 及び Asp o 21.0101 は吸入をばく露経路とする呼吸器誘発性アレルゲンであり、Pin k 2.0101 は宿主染色体の塩基配列から得られた ORF であることから、食物アレルギー誘発性の懸念は小さいと考えられた。

なお、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは認められなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を調

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(The Food Allergy Research and Resource Program; FARRP, version 21)

べる目的で、タンパク質データベース^cを用いて $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。その結果、データベース中の既知のタンパク質と相同性を示した ORF が認められたが、遺伝子導入により新たに生じたものではないことから、毒性を有する可能性は低いと考えられた。(参照 15)

第 6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

amyBE2330 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利用されてきた実績がある。

2. 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること

amyBE2330 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利用されてきた実績を有することから、有害性はないと考えられる。また、本製品の製造原料は、Food Chemicals Codex 等の規格に適合している。

第 7. 遺伝子組換え添加物に関する事項

1. 諸外国における認可、食用等に関する事項

amyBE2330 製品は、2019 年から欧米を中心に販売され、食品用加工助剤として用いられている。カナダでは食品添加物のポジティブリスト (参照 18) に、米国では GRAS のリスト (参照 19) にそれぞれ収載されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

amyBE2330 製品中に組換え DNA の残存がないことをドットブロット分析により確認した。(参照 20)

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

amyBE2330 の製品化前の酵素サンプルは、食品衛生法の規格基準を満たしている (参照 21)。また、製造原料は、食品用酵素への使用が認められた品質のものが用いられ、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、安全性に問題のある非有効成分が含まれることはないと考えられる。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

amyBE2330 は、生産菌の培養物を、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経ることで得られる。適切な製造管理の下で製造が行われるならば、これらの工程において、安全性に問題のある物質が混入することはないと考

^c NCBI データベース (検索 : 2021 年 7 月)

えられる。

5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項

amyBE2330 の製造原料及び製造方法は、従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられる。

第 8. 第 2 から第 7 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項

第 2 から第 7 までの事項により安全性の知見は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPBL007 株を利用して生産された α -アミラーゼ」について、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. *Bacillus licheniformis* Ca63株における欠失導入用ベクターを用いたDNA欠失の概要（社内文書）
2. Chapter 4: Safety evaluation of foods and food ingredients derived from microorganisms. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1990;12 (3Part2):S114-S128.
3. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊1 「病原体等のBSL分類等」
4. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程（改訂第三版）
5. *Bacillus licheniformis* TSCA Section 5(h)(4) Exemption: Final Decision Document. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra005.pdf> [accessed May 16, 2018]
6. 食品用酵素データ集. -取り扱い手法と実践-: 株式会社シーエムシー出版; 2013年7月31日
7. Purity and Digestibility of amyBE2330 protein in a tox batch ***（社内文書）
8. Analytical method for temperature and pH activity profile and temperature stability of new alpha-amylase (NZYM-AY)（社内文書）
9. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL007 to toxin proteins from NCBI and allergens（社内文書）
10. Kontinen VP, Sarvas M. The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high - level secretion. *Molecular Microbiology*. 1993;8(4):727-737
11. 遺伝子導入ベクターpJPV034のDNA塩基配列並びに構成（社内文書）
12. 遺伝子導入ベクターpJPV035のDNA塩基配列並びに構成（社内文書）
13. JPBL007株の遺伝子挿入部位の塩基配列（社内文書）
14. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL007 to toxin proteins from NCBI and allergens（社内文書）
15. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL007 to toxin proteins from NCBI and allergens（社内文書）
16. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL007 to toxin proteins from NCBI and allergens（社内文書）
17. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL007 to toxin proteins from NCBI and allergens（社内文書）
18. List of Permitted Food Enzymes
<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/5-enzymes.html>. [accessed May 11, 2020]
19. Generally Recognized as Safe (GRAS) Notice Inventory
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotice>

s&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=
[accessed May 11, 2020]

20. The analysis of residual DNA in a amyBE2330 product formulation by means of dot blot hybridization (社内文書)
21. Characterization of representative batches and tox batch from JPBL007 (社内文書)